

⑤

Int. Cl. 2:

**C 12 K 3/00**

⑱

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

A 61 K 7/32

**DEUTSCHES**



**PATENTAMT**

**DT 27 23 191 A 1**

⑪

# **Offenlegungsschrift 27 23 191**

⑰

Aktenzeichen:

P 27 23 191.0

⑳

Anmeldetag:

23. 5. 77

㉓

Offenlegungstag:

8. 12. 77

㉔

Unionspriorität:

㉔ ㉓ ㉓

21. 5. 76 Japan 59473-76

⑤④

Bezeichnung:

Kultivierung eines desodorierenden Laktobazillusstammes, dessen Lagerung sowie eine Zusammensetzung, die dessen lebende Zellen enthält

⑦①

Anmelder:

Seikenkai, Tondabayashi, Osaka (Japan)

⑦④

Vertreter:

Lange, G., Dipl.-Ing., Pat.-Anw., 4950 Minden

⑦②

Erfinder:

Nichtnennung beantragt

**DT 27 23 191 A 1**

Seikenkai  
95 Fushimido-cho  
Tondabayashi City  
Osaka Prefecture, Japan.

Minden / Westf.  
21. Mai 1977  
Anwaltsakte: 540.203

Kultivierung eines desodorierenden Laktobazillusstammes,  
dessen Lagerung sowie eine Zusammensetzung, die dessen  
lebende Zellen enthält.

709849/0993

ORIGINAL INSPECTED

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Kultivierung oder Vermehrung eines Laktobazillusstammes, dessen Wachstum oder Wachstumsförderung durch Beigabe von S- und/oder N-Verbindungen oder Schwefel enthaltende Aminosäuren zu einem Grundmaterial ermöglicht wird, dadurch gekennzeichnet, daß man den Laktobazillusstamm in dem genannten Grundmaterial oder diesem Grundmaterial, das S- und/oder N-Verbindungen und/oder niedere Fettsäuren (S.N.C.-Verbindungen) als geruchserzeugende Bestandteile von Exkrementen, und/oder eine oder mehrere Aminosäuren, bestehend aus Schwefel enthaltenden Aminosäuren (Cystin, Cystein, Methionin), Glycin, Glutaminsäure, Lysin, Alanin, Venylalanin, Arginin- und Asparaginsäure oder eine solche Verbindung enthält, die eine dieser Substanzen als Hauptbestandteil aufweist, kultiviert.
2. Verfahren zur Lagerung des Laktobazillusstammes gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man den Laktobazillusstamm in der Anwesenheit der S.N.C.-Verbindungen und/oder einer oder mehrerer Aminosäuren, die aus Schwefel enthaltenden Aminosäuren (Cystin, Cystein, Methionin) Glycin, Glutaminsäure, Lysin, Alanin, Venylamin, Arginin- und Asparaginsäuren oder einer Verbindung bestehen, die eine dieser Substanzen als Hauptbestandteil enthalten, lagert.

3. Desodorierende Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß sie lebende Zellen des Laktobazillusstammes gemäß Anspruch 1 als aktiven Bestandteil enthält.
4. Desodorierende Zusammensetzung gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Laktobazillusstamm widerstandsfähig gegenüber antibakteriellen Verbindungen einschließlich Würzmitteln ist.
5. Desodorierende Zusammensetzung nach den Ansprüchen 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Laktobazillusstamm antibiotische Produktivitätseigenschaften besitzt.

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Kultivierung eines neuartigen Laktobazillusstammes mit einem speziellen Charakter, welcher als erster von dem Erfinder gefunden und isoliert wurde. Daneben bezieht sich die Erfindung auf ein Verfahren zur Erhaltung dieser lebenden Laktobazillusstämme, ohne daß sie ihre Aktivität verlieren, sowie auf desodorierende Zusammensetzungen, die diese als aktiven Bestandteil enthalten.

Einige spezielle Stämme, die die Fähigkeit haben, schlechten Geruch, der von menschlichen oder tierischen Exkrementen, schlechtem Atem oder Vaginalgerüchen ausgeht, wurden bereits durch den Erfinder aus einer Gruppe von Laktobazillusstämmen herausgefunden und in der japanischen Patentanmeldung 134 773/1974 wie der amerikanischen Patentanmeldung 3 957 974 beschrieben. Im Anschluß hieran sind jedoch verschiedene Nachforschungen in Bezug auf die Laktobazillusstämme einschließlich derjenigen, die durch den Erfinder herausgefunden wurden, fortgesetzt worden, wobei gleichzeitig die desodorierende Aktivität dieser Stämme und deren Beziehung auf die mikrobiologischen Eigenschaften genau untersucht wurden. Die vorliegende Erfindung beruht auf diesen Untersuchungen.

Zunächst war der Erfinder erfolgreich bei der Abtrennung vieler Laktobazillusstämme mit einer hohen desodorierenden Aktivität. Derartige Stämme zeigen eine ausgezeichnete des-

odorierende Aktivität auch dann, wenn sie Mensch und Tier oral oder unmittelbar auf deren Exkremente gegeben werden. Als zweites war der Erfinder nach dem Studium dieser Stämme erfolgreich bei der Feststellung einer Beziehung zwischen der desodorierenden Aktivität dieser Stämme und deren mikrobiologischen Eigenschaften. Gleichzeitig wurde eine wesentliche Tatsache ermittelt, daß nämlich in Bezug auf die Laktobazillusstämme mit desodorierender Aktivität die Bedingungen für die Kultivierung, die Vermehrung und Erhaltung sich von derjenigen für die bekannten Stämme grundsätzlich unterscheidet. Die Ergebnisse von Untersuchungen, die durch den Erfinder in Bezug auf die desodorierenden Laktobazillusstämme durchgeführt wurden, sind nachfolgend aufgezeigt. D. h., daß die Laktobazillusstämme, die organoleptisch als solche erkannt werden können, daß sie eine desodorierende Aktivität besitzen, müssen die folgenden charakteristischen Eigenschaften besitzen:

Als wesentliche Eigenschaft müssen sie

- 1) widerstandsfähig gegen Gallenflüssigkeit sein,
- 2) geringere Ernährungsanforderungen, verglichen mit bekannten Laktobazillusstämmen stellen,
- 3) eine höhere Wachstumsrate auch in einem wenige

Nährstoffe enthaltendem Medium besitzen und

- 4) bei einzelnen oder mehreren Stämmen müssen sie die nachher noch erläuterte, durch den Erfinder ermittelte S.N.C.-Theorie erfüllen.

Als wesentliche Eigenschaften, um wirkungsvoll ihre desodorierenden Aktivitäten zu zeigen, müssen sie

- 5) eine hinreichende Produktivität an Antibiotika und Milchsäure sowie
- 6) gegenüber antibakteriellen Verbindungen einschließlich Würzmitteln eine Widerstandsfähigkeit besitzen.

Bevor im einzelnen die oben erwähnten Eigenschaften erläutert werden sollen, werden zunächst die mikrobiologischen Eigenschaften des bekannten Laktobazillus angegeben. Nach Dr. Mitsuoka wurde die Morphologie des Laktobazillus wie folgt definiert:

Gram negativ, fakultativ anaerobisch, nicht Sporen bildende Stäbe. In Abhängigkeit von den Stämmen können sie kugelig-stabförmig, gebogen-stabförmig, hornförmig oder schraubenförmig ausgebildet sein, während sie jedoch nicht viel Verzweigungen ausbilden. Sie sind normalerweise nicht frei beweglich, negativ gegenüber Katalase und reduzieren keine Nitrate. Sie zersetzen keine Gelatine und erzeugen kein Indol

709849/0993

oder Wasserstoffsulfid. Manche der Stämme sind bipolar gefärbt. Wenn überhaupt, so besitzen sie nur eine schwache Fähigkeit Protein und Fett zu zersetzen. Sie besitzen ein besseres Wachstum unter anaerobischen oder mikroaerobischen Bedingungen als unter aerobischen Bedingungen. Sie weisen eine große Fähigkeit zur Zersetzung von Zuckern auf und sind säurefest. Wenn sie zur Glukosefermentierung verwendet werden, erzeugen sie Milchsäure mit einer Ausbeute von mehr als 50 %. Sie wirken auf Tiere und Pflanzen nicht pathogen.

Darüber hinaus ist bekannt, daß die Laktobazillusstämme, die die oben aufgezeigten Eigenschaften besitzen, nur in einem Medium zu wachsen vermögen, das einen guten Nährboden darstellt, wie Aminosäuren, Peptide, Nukleinsäureanaloge, Vitamine, Salze, Fettsäuren und deren Ester und Zucker.

Die Laktobazillusstämme, die durch den Erfinder bestimmt wurden und desodorierende Aktivitäten besitzen, zeigen die gleichen morphologischen Charakteristika, wie die bekannter Laktobazillusstämme, wobei sie sich jedoch grundsätzlich von den letzteren durch die erwähnten Eigenschaften 1), 2) und 3) unterscheiden.

Die wesentlichen Punkte werden nachfolgend näher erläutert.



(A) Wie bereits erwähnt, benötigen die bekannten Laktobazillusstämme Aminosäuren, Peptide, Nukleinsäureanaloge, Vitamine, Salze, Fettsäuren oder deren Ester und Zucker für ihr Wachstum. Man kennt sie als eine Gruppe von Bakterien, die verhältnismäßig hohe Ernährungsanforderungen stellen. Dementsprechend mußten gute Nährböden wie Brigg'sche und MRS Medien im allgemeinen für die Kultivierung der Laktobazillusstämme eingesetzt werden.

(B) Die Laktobazillusstämme, die durch den Erfinder ermittelt wurden, und gemäß der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden (sie werden nachfolgend einfach als "erfindungsgemäßer Laktobazillus" bezeichnet) besitzen gegenüber dem bekannten Laktobazillus vollständig unterschiedliche Charakteristika. Das bedeutet, daß der erfindungsgemäße Laktobazillus nicht nur ein gutes Wachstum auf einem guten Nährboden, wie dem Brigg'schen Medium sondern auch, wie in Tabelle 1 dargestellt ist, ein ebenfalls gutes Wachstum in einem Medium mit wenig Nährstoffen zeigt.

T a b e l l e 1

Stämme FERM-P Nr,	verwendete Medien				
	Brigg	LC	(S-W)+ Casamino- säuren + Vitamine	(S-W)+ Vitamine	(S-W)+ Casamino- säuren
Auf dem Markt er- hältl. Lakto- bazillus	++	+++	-/+	-	-
1946	+++	+++	++	+	++
2742	+++	+++	++	+	++
2779	+++	+++	++	-	+
2780	+++	+++	++	+	+
2781	+++	+++	++	-	+
2782	+++	+++	++	-	+

(C) Wie aus der Tabelle 2 entnehmbar ist, ist der erfindungsgemäße Laktobazillus, wenn er im Brigg'schen oder MRS Medium kultiviert wird, offensichtlich dem bekannten Laktobazillus in der Wachstumsrate und der Endzellenzahl überlegen.

T a b e l l e 2

Stämme FERM-P Nr.	Medien			
	MRS		Briggs	
	Spez. Wachst.- rate ( $\gamma$ )	Zellen- endzahl ( $\text{cm}^3$ )	Spez. Wachst.- rate ( $\gamma$ )	Zellen- endzahl ( $\text{cm}^3$ )
1946	0.516	$65 \times 10^8$	0.53	$40 \times 10^8$
2742	0.597	$80 \times 10^8$	0.57	$50 \times 10^8$
2779	0.53	$60 \times 10^8$	0.51	$35 \times 10^8$
2780	0.47	$70 \times 10^8$	0.45	$40 \times 10^8$
2781	0.53	$70 \times 10^8$	0.51	$40 \times 10^8$
2782	0.47	$60 \times 10^8$	0.45	$35 \times 10^8$
Durchschnitts- wert für den bekannten Lak- tobazillus	0.40	$20 \times 10^8$	0.38	$15 \times 10^8$

(D) Außerdem sind, wie sich aus den oben erwähnten Ernährungserfordernissen ergibt, das S-W Medium (a), das S-W + Vitamine Medium (b) und sogar das S-W + Casaminosäurenmedium (c) für das Wachstum des bekannten Laktobazillus ungeeignet. Im Hinblick hierauf sind die Versuchsergebnisse, die durch den

Erfinder ermittelt wurden, in Tabelle 4 zusammengestellt.

(E) Im Gegensatz dazu vermag der erfindungsgemäße Laktobazillus nahezu immer in mindestens einem der Medien (a, b und c) zu wachsen und zeigt gleichzeitig eine gute Wachstumsgeschwindigkeit und eine gute Endausbeute (Anzahl der Zellen/cm<sup>3</sup>). Gleichzeitig wurde der erfindungsgemäße desodorierende Laktobazillus, der in dem S-W + Vitamine + Aminosäuren Medium, jedoch nicht in den oben erwähnten Medien (a, b und c) wächst weiterhin durch den Erfinder ermittelt.

Jedes der oben beschriebenen LC und S-W Medien wird nachfolgend dargestellt. LC Medium: 10 g Pepton, 10 g Fleischextrakte, 5 g NaCl, 3 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 g Glukose, 5 g Hefeextrakte, 3 g CaCO<sub>3</sub> und 10 l Wasser, pH 7,4. S-W Medium: 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,7 g MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 1 g NaCl, 4 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,03 g FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 5 g Glukose und 1 l Wasser. Brigg'sches Medium: Dieses (1953) kann hergestellt werden, gemäß "An Improved Medium For Lactobacilli" beschrieben in J. Dairy Res. 20, 36. MRS Medium: DEMAN J. C. ROGOSA M & SHARPE. M.E. (1960) wird hergestellt gemäß J. Appl Bact. 23 (1), 130 - 135.

Die in den obigen Abschnitten (D) und (E) herausgestellten Tatsachen sind in den folgenden Tabellen 3-1 und 3-2 zusammengestellt.

T a b e l l e 3-1

Stämme	Medien
	eines von (a), (b) und (c)
erfindungsgemäßer Laktobazillus	+
bekannter Lakto- bazillus	-

T a b e l l e 3-2

u und Ausbeute (Anzahl von Zellen/cm <sup>3</sup> )	
erfindungsgemäßer Laktobazillus (verwendetes Medium: (c)-Medium	÷ bekannter Lakto- bazillus (verwend. Medium: Brigg'sches Medium)

Wie hieraus deutlich wird, zeigt der erfindungsgemäße Lakto-  
bazillus, wenn er auf einem schlechten Nährboden kultiviert

wird, nahezu die gleiche Wachstumsrate und Ausbeute wie die bekannten Stämme, die auf einem guten Medium wie dem Briggs' Medium kultiviert werden. Die Untersuchungsergebnisse von sechs repräsentativen Laktobazillusstämmen nach der Erfindung, von denen ein jeder unterschiedliche Nährbodenbedingungen stellt, sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefaßt.

T a b e l l e 4

Stämme (FERM-P Nr.)	Untersuchungs- arten	Medien		
		(a)	(b)	(c)
1946	Wachstum	-	+	++
	/ <sup>u</sup>		0.17	0.53
	Ausbeute		$5 \times 10^8$	$25 \times 10^8$
2742	Wachstum	±	+	++
	/ <sup>u</sup>	0.20	0.40	0.56
	Ausbeute	$7 \times 10^8$	$20 \times 10^8$	$50 \times 10^8$
2779	Wachstum	-	-	+
	/ <sup>u</sup>			0.35
	Ausbeute			$8 \times 10^8$
2780	Wachstum	-	±	+
	/ <sup>u</sup>		0.3	0.35
	Ausbeute		$6 \times 10^8$	$20 \times 10^8$

	Wachstum	-	-	+
2781	/ <sup>u</sup>			0.53
	Ausbeute			$30 \times 10^8$
	Wachstum	-	-	+
2782	/ <sup>u</sup>			0.35
	Ausbeute			$8 \times 10^8$

Bemerkung: Die Ausbeute ist durch die Anzahl der Zellen/cm<sup>3</sup> angegeben.

(F) Es ist nie darüber berichtet worden, daß der bekannte Laktobazillus einem Wachstum oder einem verstärkten Wachstum ausgesetzt werden kann, indem man einzelne oder mehrere S-, N-, oder C-Verbindungen den oben genannten Medien (a), (b) und (c) beigibt. Wie die Tabelle 6 zeigt, führen die Untersuchungen des Erfinders zu den diesbezüglich negativen Ergebnissen.

(G) Demgegenüber zeigt im Gegenteil Tabelle 6, daß der erfindungsgemäße Laktobazillus, wenn man ihn in allen oder mindestens irgend einem der Medien (a), (b) und (c), das die S.N.C-Verbindungen und/oder Schwefel enthaltende Aminosäuren aufweist, kultiviert.

709849/0993

### Zusammenfassung der Absätze (F) und (G)

# Ernährungserfordernisse und Wachstum oder Wachstumsförderung des erfindungsgemäßen Laktobazillus

[illegible]



		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
	(c)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
2779	(a)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	(b)	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	(c)	+	++	++	++	++	++	+	++	++	+
2780	(a)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	(b)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	(c)	+	++	++	++	++	++	+	++	++	++
2781	(a)	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	(b)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	(c)	+	++	++	++	++	++	++	+-	++	++
2782	(a)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	(b)	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	(c)	+	++	++	++	++	++	+	++	++	++
Am Markt ver- fügbarer Lakto- bazillus	(a)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	(b)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	(c)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Bemerkung: I: keine Beigabe, II: Cystein, III: Cystin,

IV: Methionin, V:  $\text{Na}_2\text{S}$ , VI: Amonium, VII: Scatol,

VII: Essigsäure, IX: Buttersäure, X: Propionsäure.

Bei diesen Versuchen wurde  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  als  $\text{Na}_2\text{S}$  Eisessigsäure  
als Essigsäure und 37 %-iges wässriges Amonium als Amonim ver-  
wendet.

709849/0993

Einzelheiten der von dem Erfinder vorgeschlagenen S.N.C.-Verbindungen sollen nachfolgend aerläutert werden. Nach den Untersuchungen des Erfinders kann eine große Anzahl übelriechender Bestandteile, die in Exkrementen enthalten sind, in die folgenden drei Gruppen unterteilt werden: S-Verbindung, N-Verbindungen und C-Verbindungen. Darüber hinaus wurde festgestellt, daß die Untersuchungen zur Desodorierung übelriechender Bestandteile in den Exkrementen zu einem zufriedenstellenden Ergebnis führen, wenn man den desodorierenden Effekt auf  $\text{H}_2\text{S}$  oder  $\text{Na}_2\text{S}$  (S-Verbindungen),  $\text{NH}_3$ , Indol oder Scatol (N-Verbindungen) und niedrige Fettsäuren (C-Verbindungen) untersucht, da sie repräsentativ für die jeweiligen S.N.C.-Verbindungen sind. In diesem Zusammenhang können P-Verbindungen als zweitrangig angesehen werden. Es wurde weiterhin geklärt, daß der erfindungsgemäße Laktobazillus in einem entsprechend ausgewählten schlechten Nährboden, der als übelriechendes Inkredienziun S.N.C.-Verbindungen enthält, wächst oder Wachstumssteigerungen erfährt. Nach all diesen Betrachtungen ist der Erfinder zu einer S.N. C. Theorie gelangt bezüglich der Mikroorganismen und der Desodorierung von Exkrementen.

Die beigefügten graphischen Darstellungen erläutern die Wachstumsrate des erfindungsgemäßen Laktobazillus und des bekannten Laktobazillus in ihrer Anfangsphase. Dabei zeigt

bzw. zeigen im einzelnen:

- Fig. 1 die bewerteten Ergebnisse im LC-Medium (Grundmedium) mit einem Gehalt an Essigsäure,
- Fig. 2 die Ergebnisse in dem Grundmedium mit einem Gehalt an  $\text{Na}_2\text{S}$ ,
- Fig. 3 die Ergebnisse in dem Grundmedium mit einem Gehalt an  $\text{NH}_3$ ,
- Fig. 4 die Ergebnisse unter Beigabe von Essigsäure zu (S-W) + Vitamine + Casamino-säure,
- Fig. 5 und 6 die Ergebnisse unter Beigabe von jeweils  $\text{Na}_2\text{S}$  und  $\text{NH}_3$ ,
- Fig. 7 die Ergebnisse in einem schlechten Nährboden mit einem Gehalt an Essigsäure und
- Fig. 8 und 9 die Ergebnisse unter Verwendung von  $\text{Na}_2\text{S}$  und  $\text{NH}_3$  anstelle von Essigsäure.

Hierbei zeigt 1 die Wachstumsrate in dem einen Zusatz enthaltenen Medium und 1' diejenige des bekannten Laktobazillus in dem

709849/0993

gleichen Medium. Andererseits stellen 2 und 2' die Ergebnisse der Kontrolluntersuchungen jeweils für den erfindungsgemäßen und den bekannten Laktobazillus dar. Die Kontrolluntersuchungen wurden in einem Medium durchgeführt, das keinen Zusatz enthielt.

In Fig. 1 ist die Wachstumsrate des erfindungsgemäßen Laktobazillus dargestellt. Bei diesen Versuchen wurde ein LC-Medium als reicher Nährboden verwendet, und Essigsäure oder Buttersäure wurden beigegeben. In dieser Fig. gibt 1 die Wachstumsrate des erfindungsgemäßen Stammes in dem Medium an, das 5 g Essigsäure enthält. 1' zeigt die Wachstumsrate des bekannten Stammes in dem gleichen Medium, während 2 und 2' jeweils die Wachstumsrate des erfindungsgemäßen und des bekannten Stammes in einem Medium zeigen, das 0,1 bis 1g Essigsäure enthielt. Wie sich aus Fig. 1 ergibt, wurde das Wachstum des erfindungsgemäßen Stammes in der Anfangsphase so zögernd gefördert, daß der Grad der Wachstumsförderung völlig unsichtbar war und kaum festgestellt werden konnte, auch dann, wenn man die Anzahl der lebenden Zellen zählte, während bei dem bekannten Stamm die Wachstumsförderung deutlich sichtbar war.

In ähnlicher Weise sind die Ergebnisse, die man erhielt, indem man die Stämme in einem LC-Medium mit einem Gehalt an  $\text{Na}_2\text{S}$  (2g) oder  $\text{NH}_3$  (2g) jeweils kultivierte, in den Fig.

2 ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) und 3 ( $\text{NH}_3$ ) dargestellt. Die bekannten Stämme wurden in ihrem Wachstum bei niedrigeren Konzentrationen gehemmt als die erfindungsgemäßen Stämme, d. h., sie zeigten eine stärkere Empfindsamkeit im Hinblick auf die Wachstumshemmung. 2 und 2' zeigen die Ergebnisse von Kontrolluntersuchungen, die in einem Medium mit einem Gehalt von nur 0,1 g  $\text{Na}_2\text{S}$  oder  $\text{NH}_3$  durchgeführt wurden.

Weiterhin ist der Einfluß der S.N.C-Verbindungen auf das Wachstum des erfindungsgemäßen und des bekannten Laktobazillus in den Fig. 4 bis 6 dargestellt. Bei diesen Untersuchungen wurden die Stämme in guten, mittleren und schlechten Nährbodenmedien kultiviert und in der Anfangsphase der Stämme wurden außerdem die S.N-C-Verbindungen beigegeben. Wie sich aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen zeigt, führte die Beigabe mancher Konzentrationen von Essigsäure,  $\text{Na}_2\text{S}$  und  $\text{NH}_3$  im mittleren Nährbodenmedium zu einer Wachstumsförderung des erfindungsgemäßen Laktobazillus, während der bekannte Laktobazillus in seinem Wachstum in dem mittleren Nährbodenmedium mit einem Gehalt an  $\text{Na}_2\text{S}$  und  $\text{NH}_3$  nicht gefördert wurde.

Außerdem wächst, wie die Fig. 7 bis 9 zeigen, der bekannte Laktobazillus nicht in einem schlechten Nährbodenmedium oder gar in diesem Medium, das S.N.C.-Verbindungen enthält. Der erfindungsgemäße Laktobazillus einschließlich desjenigen, der nicht in dem (S-W) Medium wächst, wächst jedoch immer

In jedem Medium, das  $\text{Na}_2\text{S}$  enthält. Hieraus läßt sich entnehmen, daß  $\text{Na}_2\text{S}$  für das Wachstum des erfindungsgemäßen Laktobazillus wesentlich ist.

In den Fig. 1 bis 9 zeigt die ausgezogene Linie (—) den erfindungsgemäßen Laktobazillus und die gestrichelte Linie (---) den bekannten Laktobazillus. Gleichzeitig ist die oben erwähnte Beziehung in der nachfolgenden Tabelle 7 zusammengefaßt.

T a b e l l e 7

Versuchsbedingungen		Laktobazillus	
		bekannt. Laktobazill.	erfindungsgemäße Laktobazillus
Wachstumsgrad		++	+++
gutes Nährbodenmedium	beigegeb. Verbindungen		
	Essigsäure	⊙	○
	Buttersäure		
	$\text{Na}_2\text{S}$	X	X
	$\text{NH}_3$	X	X

Wachstumsgrad		+/-	++
<hr/>			
mittleres Nährbodenmed.	beigeg. Verbindg.		
Essigsäure Buttersäure	O ~ X		⊙
Na <sub>2</sub> S	X		⊙
NH <sub>3</sub>	X		⊙
Wachstumsgrad		-	+

schlecht. beigege.  
Nährbodenm. Verbindg.

Essigsäure Buttersäure	X	⊙
Na <sub>2</sub> S	X	⊙
NH <sub>3</sub>	X	⊙

Bemerkung: ⊙ bedeutet, daß die Verbindung für das Wachstum des Stammes oder dessen Wachstumssteigerung bemerkenswert förderlich ist,  
 ○ bedeutet, daß die Verbindung das Wachstum des Stammes nur leicht fördert,

- ① bedeutet, daß die Verbindung dem Wachstum des Stammes gut förderlich ist,
- X bedeutet, daß die Verbindung das Wachstum des Stammes nicht beeinflusst,
- X bedeutet, daß die Verbindung das Wachstum des Stammes hemmt.

Damit der erfindungsgemäße Laktobazillus seine desodorierende Aktivität wirkungsvoller zeigt, sollte er vorzugsweise außer den oben erwähnten noch die folgenden Charakteristika aufweisen:

- 1) Zunächst sollten die Laktobazillusstämme eine hohe Produktivität von Antibiotika besitzen. Der erfindungsgemäße Laktobazillus umfaßt solche, die eine hohe, niedrige und keine Produktivität von Antibiotika besitzen.
- 2) Als zweites bevorzugtes Charakteristikum sollte der Laktobazillus widerstandsfähig gegenüber antibakteriellen Verbindungen wie Antibiotika und Würzmitteln sein. Die erfindungsgemäßen Stämme zeigen ihre Auswirkungen nicht in hinreichendem Maße, wenn sie nicht gegenüber den verwendeten, antibakteriellen Verbindungen widerstandsfähig gemacht sind. Diese Tatsache läßt sich aus den Versuchsergebnissen unter Verwendung von erfindungsgemäßen Laktobazillusstämmen als Brennbarkeitshemmer oder Desodorant entnehmen, wobei ein Beispiel eines solchen Versuchs unter der Verwendung als Desodorant in Tabelle 8 dargestellt ist.



T a b e l l e 8

Tetracyclin 250 ml 4 Tabletten/Tag ( per oral)	<u>Wirkung der Desodorierung</u>	
	Tetracyclin em- pfindl. Stamm	Tetracyclin widerstandsfähig. Stamm
Desodorierungsgrad von Exkrementen	3' - 4	1

Der erfindungsgemäße Laktobazillusstamm wurde in der Anwesenheit von Tetracyclin angebaut, und der sich ergebende Tetracyclin resistente Stamm wurde Menschen oral zugeführt. Hierauf wurde Tetracyclin (4 Tabletten pro Tag) weiterhin eingenommen. Andererseits wurde der empfindliche Stamm als Kontrollgruppe verwendet. Wie die Tabelle 8 zeigt, führt der resistente Stamm zu der erwarteten desodorierenden Aktivität, während die empfindlichen Stämme nahezu keine Wirkung aufzeigten.

3) Das ander bevorzugte Charakteristikum ist die Widerstandsfähigkeit gegen Gallenflüssigkeit. Gallenflüssigkeit besitzt eine starke antibakterielle Aktivität und wurde früher als Desinfektionsmittel verwendet. Dementsprechend sollten

die erfindungsgemäßen Laktobazillusstämme gegenüber Gallenflüssigkeit widerstandsfähig sein, wenn sie für die Desodorierung von Exkrementen eingesetzt werden, indem man sie in den Eingeweiden wachsen läßt. Darüber hinaus wurde diese Tatsache durch Experimente bestätigt, die unter Verabreichung der Stämme an Menschen und Tieren durchgeführt wurden, wobei ein Beispiel eines solchen Versuchs in Tabelle 9 dargestellt ist.

T a b e l l e 9

erfindungsgemäßer Laktobazillus	Grad der Desodorierung (2 Tage nach der oralen Verab- reichung)
gegen Gallenflüssigkeit empfindliche Stämme	3'
nicht-empfindliche Stämme auf 25 % Gallenpulver	1

Wie sich hieraus ergibt, zeigte der erfindungsgemäße Laktobazillus, der gegenüber einem 25 %-igen Gallenpulver resistent gemacht war, eine hinreichende desodorierende Aktivität, während die gegenüber Gallenflüssigkeit empfindlichen Stämme diese Aktivität kaum zeigten.

Durch die Untersuchungen des Erfinders bezüglich der Bedingungen für die Kultivierung, den Anbau und die Vermehrung der erfindungsgemäßen Laktobazillusstämme wurde herausgefunden, daß die Stämme in Abhängigkeit von den eingesetzten Medien in ihrer desodorierenden Aktivität im Laufe deren Anbau oder Vermehrung nachließ. Um dieses Phänomen weiter zu untersuchen, wurde daher die desodorierende Aktivität der erfindungsgemäßen Stämme untersucht, indem man sie in einem guten, mittleren und schlechten Nährbodenmedium anbaute, welches wahlweise Milchpulver (das nicht für das Wachstum des Laktobazillus als bevorzugt bekannt ist) oder Gallenflüssigkeitssäuren enthielt. Bei diesen Untersuchungen wurden die Medien, die im wesentlichen aus dem bereits erwähnten MRS- oder LC-Medium, Milchpulver oder einer Mischung hieraus bestehen, als gute Nährbodenmedia eingesetzt. Das Medium, das man erhielt, indem man 0,5 g  $\text{Na}_2\text{S}$ , 0,5 g Scatol und 1 g Buttersäure (Bestandteile von Exkrementen) (nachfolgend als "F-Bestandteil" bezeichnet) entweder dem MRS-Medium oder dem LC-Medium, Milchpulver oder einer Mischung davon beigab, wurde ebenfalls als gutes Nährbodenmedium eingesetzt. Andererseits bestanden die mittleren Nährbodenmedien im wesentlichen aus einer Mischung von dem (S-W) Medium, Aminosäuren und Vitaminen. Ein Medium, das man erhielt, wenn man F-Bestandteile und/oder Milchpulver der Mischung beigab, wurde ebenfalls als schlechtes Nährbodenmedium eingesetzt. Beispiele für die

709849/0993

ORIGINAL INSPECTED  
COPY

Zusammensetzungen dieser Medien sind nachfolgend angegeben:

- (I) Schlechte Nährbodenmedien: 1) (S-W) Medium + 1 g Casaminsäuren + 10 g Gallenpulver; 2) 1) + F-Bestandteile; 3) 1) + 30 g Milchpulver; 4) 3) + F-Bestandteile; 5) (S-W) Medium + 0,1 g Vitamine + 10 g Gallenpulver; 6) 5) + F-Bestandteile; 7) 5) + 30 g Milchpulver; 8) 7) + F-Bestandteile.
- (II) Mittlere Nährbodenmedien: 9) (S-W) Medium + 1 Casaminsäuren + 1 g Hefeextrakte + 10 g Gallenpulver; 10) 9) + F-Bestandteile; 11) 9) + 30 g Milchpulver; 12) 11) + F-Bestandteile; 13) 2 Pepton + 0,005 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  + 0,5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 1 g NaCl + 1 g Gallenpulver; 14) 13) + F-Bestandteile; 15) 1/10 MRS-Medium; 16) 14) + F-Bestandteile; 17) 1/3 MRS Medium; 18) 17) + F-Bestandteile.
- (III) Gute Nährbodenmedien: 19) MRS-Medium; 20) 19) + F-Bestandteile; 21) MRS + 10 g Gallenpulver; 22) 21) + F-Bestandteile; 23) MRS + 30 g Milchpulver; 24) 23) + F-Bestandteile; 25) MRS + 30gMilchpulver + 10 g Gallenpulver; 26) 25) + F-Bestandteile; 27) Milchpulvermedium; 28) 27) + F-Bestandteile; 29) LC-Medium; 30) 29) + F-Bestandteile; 31) LC-Medium + 10 g Gallenpulver; 32) 31) + F-Bestandteile.

Die desodorierende Aktivität der Stämme, die untersucht wurden, indem sie während einer mittleren Dauer in diesen Medien ange-

baut wurden, soll nachfolgend erläutert werden.

- (I) Zunächst wurde beobachtet, daß die desodorierenden Laktobazillusstämme ihre Wachstumsrate im beginnenden und mittleren Status oder weiter über den gesamten Ablauf ihres Wachstums steigern, indem man F-Bestandteile in eines der schlechten Nährbodenmedia (Nr. 1 bis 8) gibt, obwohl die spezielle Wachstumsrate der Stämme in Abhängigkeit von den verwendeten Medien unterschiedlich war. Darüber hinaus änderte sich die desodorierende Aktivität der Stämme nicht bei dem Anbau über einen Zeitraum in dem schlechten Nährbodenmedium, das keine F-Bestandteile enthielt. Demgegenüber steigerten manchmal die Stämme ihre desodorierende Aktivität durch wiederholten Anbau in der Anwesenheit von F-Bestandteilen.
- (II) Die Stämme zeigten ein starkes Wachstum in den guten Nährbodenmedien (19 bis 32), und die Auswirkung von F-Bestandteilen auf ihre Wachstumssteigerung war völlig unsichtbar und konnte auch nicht durch Zählung der Anzahl der lebenden Zellen ermittelt werden. Darüber hinaus zeigten die Stämme, wenn sie in den guten Nährbodenmedien angebaut wurden, eine rapide Abnahme ihrer desodorierenden Aktivität durch wiederholte Anbauvorgänge, unabhängig davon, ob den Medien F-Bestandteile beigegeben wurden oder nicht. Laktobazillusstämme (beispielsweise diejenigen, die zur Her-

stellung handelsüblicher Milchgetränke verwendet werden), welche weder in mittleren Nährbodenmedien wachsen noch eine wesentliche desodorierende Aktivität zeigen, wurden in ihrem Wachstum durch die Beigabe von F-Bestandteilen zu den schlechten und mittleren Nährbodenmedien gehemmt, während sie gleichzeitig keine Empfindlichkeit in den hohen Nährbodenmedien zeigten, wie im Fall der erfindungsgemäßen Laktobazillusstämme.

Wie sich aus den obigen Erläuterungen klar ergibt, wird, um den Aktivitätsverlust der desodorierenden Laktobazillusstämme zu verhindern, das Wachstum der Stämme durch die Beigabe von F-Bestandteilen zu dem Medium stimuliert, und es muß für die Kultivierung ein Medium eingesetzt werden, das F-Bestandteile enthält. Die Abnahme der Aktivität der desodorierenden Laktobazillusstämme wurde dementsprechend im Laufe der Experimente beobachtet. Darüber hinaus war von großer Wichtigkeit, da ein derartiges Phänomen während des Anbauens und Lagerns dieser Stämme beobachtet wurde, nach Bedingungen für den Anbau der Stämme zu suchen, um gleichzeitig ihre starke Aktivität aufrechtzuerhalten. Angesichts der Tatsache, daß die desodorierenden Laktobazillusstämme manchmal ihre Aktivität durch den Anbau in schlechten Nährbodenmedien mit einem Gehalt an F-Bestandteilen steigern, und daß ihre Aktivität durch den Anbau in guten Nährbodenmedien stark abfällt, hat der Erfinder Versuche unter Verwendung der schlechten Nährbodengrundmedien durchgeführt, die gegebenenfalls S.N.C-Verbindungen, wie beispielsweise geruch-

erzeugende Bestandteile von Exkrementen, wie sie durch den Erfinder klassifiziert worden sind, enthielten. Die Tabelle 10 zeigt typische und erläuternde Beispiele derartiger Versuche.

T a b e l l e 10

dem Grundmedium beigegebene Verbindungen	3. Generation	6. Generation	9. Generation
0,5 g $\text{Na}_2\text{S}$ + 0,5 g $\text{NH}_3$ + 1 g Essigsäure	⊙	⊙	⊙
1 g Essigsäure	⊙ ~ ⊙	⊙	○
5 g Magermilch	⊙ ~ ○	○ ~ x	x

Während in den oben erwähnten Experimenten  $\text{Na}_2\text{S}$ ,  $\text{NH}_3$  und Essigsäure repräsentativ für solche Verbindungen eingesetzt wurden, die dazu dienen, die Aktivität der Stämme zu erhalten, wurde gleichzeitig deutlich gemacht, daß die von dem Erfinder als S.N.C.-Verbindungen bezeichnete Zusammensetzungen, wie beispielsweise Methylsulfid, Mercaptan, Scatol, Indol, Buttersäure und Propionsäure in all den Fällen nahezu die gleichen Ergebnisse, wie oben aufgezeigt, insoweit erbringen, wenn sie in

Kombination mit den S. N. C.-Verbindungen eingesetzt werden. Die Änderungen in der desodorierenden Aktivität der Stämme, die ermittelt wurde, indem man verschiedene Aminosäuren und Proteine dem Grundmedium beigab, sind in der folgenden Tabelle 11 aufgeführt.

T a b e l l e 11 (A)

Dem Grundmedium beigegebene Zusammensetzungen (z. B. S-W + Vitamine)		Anbauergebnisse		
		3.	6.	9.
		Generation		
Protein	Pepton	x	X	X
Peptid	Fleischextrakte	x	X	X
	Magermilch	x		X
Amino- säuren	Cystin	⊙	⊙	⊙
	Cystein	⊙	⊙	○
	Methionin	⊙	⊙	○
	Alanin	○	x	X
	Phenylalanin	○	x	X
	Arginin	○	x	X
	Asparagin	○	x	x
	Asparaginsäure	○	x	x
	Glycin	○	x	x
	Glutaminsäure	⊙	⊙	○
	Aminobuttersäure	x	x	X



	3. Generation	6.	9.
Leucin	x	x	X
Isoleucin	x	x	X
Histidin	x	x	x
Prolin	x	X	X
Lysin	⊙	○	x
Tyrosin	x	x	X
Tryptophan	x	X	X
Threonin	x	X	X
Serin	x	X	X

Bemerkung: ⊙ : keine Aktivitätsabnahme  
 ⊙ : leichte Aktivitätsabnahme  
 ○ : mäßige Aktivitätsabnahme  
 x : Aktivitätsabnahme  
 X : bemerkenswerte Aktivitätsabnahme

(S-W) bezieht sich auf das Stephenson-Whetham Medium. Wie sich deutlich aus Tabelle 11 (A) ergibt, bewirken die spezifischen vier bis fünf Aminosäuren eine Aufrechterhaltung der Aktivität der Stämme während ihres Anbaues. Im Gegensatz dazu führen andere Aminosäuren wie Prolin und Tyrosin zu einer rapiden Ab-

nahme der desodorierenden Aktivität der Stämme. Es zeigt sich, daß es zuerst durch diese Versuche bestätigt wurde, daß sich die Aminosäuren im wesentlichen in drei Gruppen einteilen lassen: Die erste Gruppe von Aminosäuren halten die Aktivität der desodorierenden Laktobazillusstämme aufrecht. Die zweite Gruppe von Aminosäuren, wie Glycin, Glutaminsäure und Lysin, führen zu einem leichten Zurückgehen der Aktivität der Stämme. Die dritte Gruppe führt zu einer bemerkenswerten Abnahme der Aktivität. Obwohl man beobachtet hatte, daß die desodorierenden Laktobazillusstämme ihre Aktivität verringern, wenn sie in einem guten Nährbodenmedium angebaut werden, um sich dort zu vermehren, zeigte der Erfinder die Lösung dieses Problems aufgrund der oben erwähnten Erkenntnisse auf. Darüber hinaus waren die oben erwähnten Untersuchungen auch insofern bedeutungsvoll als manche andere Verbindungen als die geruchserzeugenden Bestandteile von Exkrementen wie die S.N.C-Verbindungen nützlich sind, um die Aktivität der Stämme während ihres Anbaues aufrechtzuerhalten. Es wurde außerdem herausgefunden, daß auch eine einzige Verbindung wirkungsvoll einsetzbar ist, um die Aktivität der erfindungsgemäßen Laktobazillen insoweit aufrechtzuerhalten, als die Verbindung S.N.C. enthält. Unter einem praktischen Gesichtspunkt erhalten diese Erkenntnisse eine große Bedeutung.

Wie in Tabelle 11 (B) dargestellt ist, zeigen sich gute Erfolge auch durch die Verwendung einer Mischung von S.N.C.-Verbind-

ungen und besondere Aminosäuren.

T a b e l l e 11 (B)

S.N.C.-Verbindungen	den S.N.C.-Verb. beigegeb. Amino- säuren	Anbauergebnisse		
		3. Generation	6.	9.
0,2 g Na <sub>2</sub> S + 0,2 g NH <sub>3</sub> + 0,4 g Essig- säure	Cystin	⊙	⊙	⊙
	Cystein	⊙	⊙	⊙
	Methionin	⊙	⊙	⊙
	Glycin	⊙	⊙	⊙
	Glutaminsäure	⊙	⊙	⊙
	Asparagin	⊙	⊙	⊙
	Asparaginsäure	⊙	⊙	⊙
	Lysin	⊙	⊙	⊙
	Arginin	⊙	⊙	⊙
	Phenylalanin	⊙	⊙	○
0,5 g Na <sub>2</sub> S + 0,5 g NH <sub>3</sub> + 1 g Essigsäure	Casaminsäure	⊙	⊙	○

Unter Bezugnahme auf die Lagerverfahren und pharmazeutischen Zusammensetzungen:

Verschiedene Lagerverfahren für Stämme und pharmazeutische

Zusammensetzungen, die diese enthalten, sind bereits bekannt. Die erfindungsgemäßen Laktobazillusstämme können mittels verschiedener bekannter Verfahren, wie Abkühlen, Trocknen, Vakuum trocknen oder in flüssiger Form gelagert werden. Wie jedoch durch die Versuche des Erfinders bereits gezeigt wurde, muß bei der Lagerung der Stämme manchmal besondere Sorgfalt angewendet werden, um eine Abnahme der desodorierenden Aktivität zu verhindern, bei welcher es sich um eine charakteristische Eigenschaft der erfindungsgemäßen Laktobazillusstämme handelt. Im besonderen, wenn die Stämme bei einer niedrigen oder mittleren Temperatur flüssig oder durch Abkühlen oder Trocknen in der Anwesenheit einer Verbindung, die beim Anbau der Stämme zur Herabsetzung deren Aktivität führt, gelagert werden, führt auch dies zu einer Abnahme in ihrer desodorierenden Aktivität, wie im Falle des Anbaus.

Die Tabellen 12 und 13 zeigen die Ergebnisse von Versuchen, die der Erfinder durchgeführt hat.

T a b e l l e 12

dem Grundmedium beige- geb. Zusammsetzg. (z.B. S-W + Vitamine)	Auswirkungen der Zusammensetzungen auf die Lagerung der Stämme				
	28° C		8° C		
	getrockn. getr.	halb getr.	feucht getr.	getrockn. getr.	halb feuch getr.
Na <sub>2</sub> S	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙
Methylsulfid	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙

	28° C			8° C		
	getrock.	halb feucht getr.		getrock.	halb feucht getr.	
NH <sub>4</sub> Cl	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙
Mercaptan	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙
Scatol	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙
Indol	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙
Natriumacetat	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙
Natriumbutyrat	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙
Natriumprpionat	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙

Bemerkung: (S-W) : wie oben definiert.

Die Tabelle 12 zeigt die Ergebnisse von Versuchen, die in der Anwesenheit einer geeigneten Menge einer S.N.C.-Zusammensetzung ausgeführt wurden, wobei das Ergebnis zeigt, daß die Zusammensetzungen in einer wirkungsvollen Weise die desodorierende Aktivität der Stämme aufrechterhalten.

T a b e l l e 13

dem Grundmedium beigegeg. Zusammensetzungen (z. B. S-W + Vitamine)		Auswirkungen der Zusammensetzungen auf die Lagerung der Stämme					
		28° C			8° C		
		getrock.	halb getr.	feucht	getrock.	halb getr.	feuc
Protein + Peptid	Pepton	X	X	X	X	X	X
	Fleischextrakte	X	X	X	X	X	X
	Magermilch	x	x	x	x	x	x
Amino- säuren	Cystin	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙
	Cystein	⊙	⊙	○	⊙	⊙	○
	Methionin	⊙	⊙	○	⊙	⊙	○
	Alanin	x	x	x	x	x	x
	Phenylalanin	x	x	x	x	x	x
	Arginin	○	x	x	○	○	x
	Asparagin	x	x	x	x	x	x
	Glycin	○	x	x	○	x	x
	Glutaminsäure	○	○	x	⊙	○	x
	Aminobuttersäur.	x	x	x	x	x	x
	Leucin	x	x	x	x	x	x
	Isoleucin	x	x	x	x	x	x
	Histidin	⊙	x	x	○	x	x
	Prolin	x	x	x	x	x	x
	Lysin	○	○	x	○	○	x
	Tyrosin	x	x	x	x	x	x

	28° C			8° C		
	getrock.	halb. getr.	feucht	getrock.	halb. getr.	feucht
Tryptophan	x	x	x	x	x	x
Threonin	x	x	x	x	x	x
Serin	x	x	x	x	x	x

Bemerkung: getrocknete Form: Wassergehalt = 8 %; halbgetrocknet: Wassergehalt = 15 %; feucht: eine Fermentierungsbrühe des Stammes oder einer Masse aus lebenden Zellen des Stammes. Die unter trockenen Bedingungen gelagerten Stämme halten ihre desodorierende Aktivität über einen längeren Zeitraum, verglichen mit denjenigen, die unter feuchten Bedingungen gelagert sind.

Gleichzeitig verlieren auch die mit Milch überzogenen Stämme, wenn sie durch Lyophilisierung oder bei einer extrem niedrigen Temperatur gelagert werden, nicht ihre desodorierende Aktivität, sondern werden in einem guten Zustand gehalten. Doch auch in solchen Fällen überzieht man bevorzugt die Stämme mit Schwefel enthaltenden Aminosäuren.

Wie im Falle des oben erwähnten Anbaues, erhält man auch gute Ergebnisse sowohl im trockenen, halbtrockenen oder angefeuchteten Zustand, wenn die Stämme in der Anwesenheit einer Mischung von S.N.C.-Zusammensetzungen und Aminosäuren gelagert werden.

Aus der Tabelle 13 ergibt sich, daß ein Überziehen der Stämme mit Aminosäuren, wie Cystin oder Methionin für deren Lagerung geeignet ist. Dies zeigt an, daß die Stämme gemäß der Erfindung direkt einem lebenden Körper verabreicht werden können. Außerdem zeigt sich, daß auch verschiedene andere Methoden als eine Lyophilisierung und Lagerung bei niedriger Temperatur eingesetzt werden können, um verschiedene Formen pharmazeutischer Zusammensetzungen herzustellen. Wenn beispielsweise die Stämme in einem Medium angebaut werden, das eine große Menge  $\text{Na}_2\text{S}$ ,  $\text{NH}_3$  und Buttersäure enthält, und sie diese Mengen nicht vollständig verdauen, so müssen die Stämme ausgiebig gewaschen werden. Diese Waschung beeinträchtigt die Lagerbedingungen der Stämme. Aus den oben erwähnten Fakten ergibt sich jedoch, daß in solchen Fällen Cystin und Methionin, die für den lebenden Körper als geeignet anerkannt sind, als Überzugsmittel für die Stämme eingesetzt werden können.

Verschiedene Eigenschaften der desodorierenden Stämme gemäß der Erfindung, wie deren biochemische Eigenschaft und desodorierende Aktivität werden nachfolgend erläutert unter Bezugnahme auf sechs Stämme als repräsentative Beispiele.

Die Tabelle 14 zeigt die biochemischen Eigenschaften. Auf der anderen Seite ist die Beziehung zwischen den Ernährungserfordernissen und dem Wachstum der Stämme in den Tabellen 15 und



16 dargestellt. Weiterhin zeigt die Tabelle 17 die Wirkungen der Stämme auf die Desodorierung von Exkrementen. Die in Fig. 17 zusammengefaßten Versuche wurden durchgeführt, indem man einige Schleifen von Stämmen oder einer Fermentationsbrühe frischen Exkrementen oder einer fünffachen Verdünnung hiervon beigab, und dann die Mischung kultivierte.

T a b e l l e 14

Mikroskopische Beobachtung und morphologische Charakteristika

	1946	2742	FERM-P Nr. 2779	2780	2781	2782
Gram	+	+	+	+	+	+
Form	kurz. Stab runde Enden	Kokken- bazillen	kurz. Stab, rd. Enden	Kokken- rd. bazillen	Kokken- bazillen	kurz. Stab rd. Enden
Fragella Kapsel	-	-	-	-	-	-
Beweglich- keit	-	-	-	-	-	-
Kultivierung	anaerob bis mikroaerophil					
in einem Med- ium von (Agar+ Zucker + Vitamine)	runde Mittelkolonien					
Projektion	halb sphärisch dick	halb sphär. dick	halb sphäri. mittel	halb sphärisch dick	dünn	halb sphärisch dick
Oberfläche	glatt, befeuchtet					
Umfang	eben					
Farbe	milchig weiß, un- durchsicht. schleimig	milchig weiß, un- durchsicht. sichtg. schleimig	milchig weiß, un- durchs. schleimig	milch. weiß, un- durchs. schleimig	Weiß undurch- sichtig schleimig	milchig weiß, un- durchsicht. schleimig

T a b e l l e 15  
(Allgemeine Eigenschaften)

	FERM-P Nr.					
	1946	2742	2779	2780	2781	2782
Ammoniak- erzeugung	-	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S-Erzeugung	-	-	-	-	-	-
Indolerzeugung	-	-	-	-	-	-
Catalaseerzeugung	-	-	-	-	-	-
Pigmenterzeugung	-	-	-	-	-	-
Gelatineverflüssi- gung	-	-	-	-	-	-
Verwendung von Zitronensäure	-	-	-	-	-	-
Zersetzung von Harnstoff	-	-	-	-	-	-
M.R. Reaktion	+	+	+	+	+	+
V. P. Reaktion	-	-	-	-	-	-
Reduktion von Nitraten	-	-	-	-	-	-

T a b e l l e 16

(Fähigkeit zum Abbau von Zuckern)

	FERM-P Nr.					
	1946	2742	2779	2780	2781	2782
Ribose	-	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+	+
Laktose	+	+	+	+	+	+
Melebiose	+	+	+	+	+	+
Raffinose	-	+	-	-	-	-
Melezitose	-	+	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-	-

709849/0993

T a b e l l e 17-1

Desodorierung tierischer Exkreme  
(unmittelbar auf die Exkreme aufgebracht)

Stämme	Tiere	Frische Exkreme Gesamtgewicht: 2g (%)	Kontrolle (kein Stamm wurde beige- geben)	den Exkrementen be- gegebene Stämme: Menge an lebenden Zellen (3 Schleife voll) Dauer d. Kultivier- nach der Beigabe		
				24	48	72
1940	Hunde	100	4	2'	2	1'
		20	4	2'	1	1'
	Kühe	100	4	1'	1'	1'
		20	4	1'	1	1'
	Schweine	100	4	2	2	1'
		20	4	2	2	1'
	Hühner	100	4	2	2	1'
		20	4	2	2	1'
	Menschen	100	4	2'	2	1'
		20	4	2'	2	1'
2742	Hunde	100	4	3	2'	2
		20	4	3	3	2'
	Kühe	100	4	2	1'	1'
		20	4	2	1'	1'
	Schweine	100	4	3	3	2'
		20	4	3	3	2'
	Hühner	100	4	3	3	2'
		20	4	3	3	2'
	Menschen	100	4	3	2'	2
		20	4	3	3	2
2779	Hunde	100	4	3	2'	2
		20	4	3	3	2'
	Kühe	100	4	2	1'	1'
		20	4	2	1'	1'
	Schweine	100	4	3	3	2
		20	4	3	3	2
	Hühner	100	4	3	3	2
		20	4	3	3	2
	Menschen	100	4	3	2'	2
		20	4	3	3	3
2780	Hunde	100	4	2'	2	1'
		20	4	2'	2	1'
	Kühe	100	4	2	1'	1'
		20	4	2	1'	1

2781	Schweine	100	4	2'	2	1'
		20	4	2'	2	1'
	Hühner	100	4	2'	2	1'
		20	4	2'	2	1'
	Menschen	100	4	2'	2	1'
		20	4	2'	2	1'
	Hunde	100	4	3	2'	2
		20	4	3	2'	2
	Kühe	100	4	2	2	2
		20	4	2'	2'	2
	Schweine	100	4	3	3	2
		20	4	3	3	2
	Hühner	100	4	3	3	2
		20	4	3	3	2
	Menschen	100	4	3	2'	2
		20	4	2'	2'	2
2782	Hunde	100	4	2'	2	1'
		20	4	2	2	1'
	Kühe	100	4	2	2	1'
		20	4	2	1'	1'
	Schweine	100	4	3	2	1'
		20	4	3	2	1'
	Hühner	100	4	3	2	1'
		20	4	2	2	2'
	Menschen	100	4	2'	2'	2
		20	4	3	2'	2

Bemerkung: Exkremente (%): 100 % : 100 % Exkremente

20 % : 20 % Exkremente, 80 % Wasser

lebende Zellen: drei Schleifen voll des auf Petri-  
schalen kultivierten Stammes wurden  
den Exkrementen beigegeben.

frische Exkre-  
mente:

gerade ausgeschiedene Exkremente.

T a b e l l e 17-2

Desodorierung tierischer Exkremente  
(unmittelbar auf die Exkremente aufgebracht)

	Stämme	Tiere	Frische Exkremente Gesamtgewicht: 2g (%)	Kontrolle (kein Stamm wurde beige- geben)	den Exkrementen b gegeb. Stämme: Me an lebenden Zelle (3 Schleifen voll Dauer d. Kultivie nach der Beigabe		
					24	48	72
1940	Hunde	100		4	2	2	1'
		20		4	2	1'	1'
	Kühe	100		4	1	1'	1'
		20		4	2	2	1'
	Schweine	100		4	2'	2	1'
		20		4	2'	2	1'
	Hühner	100		4	2'	2	1'
		20		4	2'	2	1'
	Menschen	100		4	2'	2	1'
		20		4	2	2	1'
2742	Hunde	100		4	3	3	2'
		20		4	3	3	3
	Kühe	100		4	2	1'	1'
		20		4	2	2	2
	Schweine	100		4	2'	2	2
		20		4	2'	2	2
	Hühner	100		4	3'	3	2'
		20		4	3'	3	2
	Menschen	100		4	3	2'	2
		20		4	3	2'	2
2779	Hunde	100		4	3	3	2'
		20		4	3'	3	3
	Kühe	100		4	2	1'	1
		20		4	2	2	2
	Schweine	100		4	2'	2	2
		20		4	2'	2	2
	Hühner	100		4	3'	2'	2
		20		4	3'	2'	2'
	Menschen	100		4	3	2'	2
		20		4	3	2'	2

2780	Hunde	100 20	4 4	2' 2'	2' 2'	2 2
	Kühe	100 20	4 4	2 2	1' 2	1' 1'
	Schweine	100 20	4 4	2' 2'	2 2	1' 1'
	Hühner	100 20	4 4	2' 2	2 2	1' 1'
	Menschen	100 20	4 4	2' 2	2 1'	2 1'
2781	Hunde	100 20	4 4	3' 2	3 2	2' 2'
	Kühe	100 20	4 4	2 2	2 2	2 2
	Schweine	10 <sup>0</sup> 20	4 4	2' 2'	2 2	1' 2
	Hühner	100 20	4 4	2' 3'	2 2	2 2'
	Menschen	100 20	4 4	2' 3	2 2	2 2
2782	Hunde	100 20	4 4	2 2	1 2	1' 1'
	Kühe	100 20	4 4	2 2	1' 2	1 1'
	Schweine	100 20	4 4	2' 2'	2 2	1' 1'
	Hühner	100 20	4 4	2' 2'	2 2	1' 2'
	Menschen	100 20	4 4	2 2	2 2	1' 2

Bemerkung: Fermentationsbrühe: die Stämme wurden 48 Stunden lang in Teströhren kultiviert, und 5 ml der Fermentationsbrühe wurden den Exkrementen beigegeben.

Die Tabelle 18 zeigt die Wirkungen der Stämme auf die Desodorierung von Exkrementen. Die Untersuchungen wurden durchgeführt, indem man repräsentative sechs Laktobazillusstämme gemäß

der Erfindung in dem folgenden Medium kultivierte und oral verschiedenen Tieren und Menschen verabreichte.

Zusammensetzung des verwendeten Mediums:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Stärke,  $\text{CaCO}_3$ , Casaminosäuren, Hefeextrakte,  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , Essigsäure, Buttersäure, Propionsäure, Ammoniak, Indol, Scatol, Cystin und Vitamine. Nachdem die Stämme in dem Medium kultiviert waren, wurden die lebenden Zellen durch Zentrifugierung gesammelt. Die so gesammelten Stämme wurden in der Form eines nassen Kuchens mit Brot oder Butter gemischt und oral mit einer Dosis von 0,5 g/kg verabreicht. Die Auswirkungen auf die Desodorierung der Exkremente wurde vom auf die Verabreichung folgenden Tag ermittelt.

Der Grad der Desodorierung wird im Rahmen der Erfindung wie folgt definiert: 0 kein Geruch; 1 ganz schwacher Geruch; 1' sehr geringer Geruch; 2 anfangs wird ein geringer Geruch festgestellt, der jedoch bald verschwindet; 2' geringer Geruch; 3 der Geruch ist geringer als derjenige, der Kontrollgruppe; 4 der Geruch als solcher der Kontrollgruppe.



T a b e l l e 18-1

Desodorisierungswirkung  
(per os)

Stämme (FERM-P Nr)	
Lebewesen	
	1946
	2742
Hunde	Die desodorierende Wirkung zeigte sich zwei Tage nach der Verabreichung und hielt etwa 30 Tage an. Danach nahmen die Exkremente wieder allmählich ihren üblichen Geruch an.
	Die desodorierende Wirkung begann zwei Tage nach der Verabreichung und hielt fünf Tage an. Danach nahmen die Exkremente wieder ihren ursprünglichen Geruch allmählich an.
Schweine	Die desodorierende Wirkung begann zwei Tage nach der Verabreichung und hielt für etwa 20 Tage an. Danach nahmen die Exkremente wieder ihren Geruch in der gleichen Weise an wie oben.
	Die desodor. Wirkung begann zwei Tage nach der Verabreichung und hielt etwa drei bis 4 Tage an. Danach nahmen die Exkremente wieder in der gleichen Weise wie oben ihren Geruch an.
Hühner	Die desod. Wirkung begann zwei Tage nach der Verabr. und hielt etwa 15 Tage an. Danach nahmen die Exkremente ihren Geruch in der gleichen Weise wie oben wieder an.
	wie oben
Menschen	Die desod. Wirkung begann zwei Tage nach der Verabr. und hielt etwa 15 Tage an. Danach nahmen die Exkremente ihren Geruch in der gleichen Weise wie oben wieder an.
	wie oben

Bemerkung: Hunde: Durchschnittswert 50 Hunde  
 Schweine: Durchschnittswert 20 Schweine  
 Hühner : Durchschnittswert 30 Hühner  
 Menschen: Durchschnittswert 30 Menschen

T a b e l l e 18-2

Desodorierungswirkung  
(per os)

Lebewesen	Stämme (FERM-P Nr)	
	2779	2780
Hunde	Der Stamm zeigte nahezu die gleichen Wirkungen wie diejenigen des Stammes Nr. 2742	Die desodor. Wirkungen zeigten sich zwei Tage nach der Verabreichung., sie waren jedoch nicht so stark u. verschwanden in sieben bis zehn Tagen.
Schweine	wie oben	wie oben
Hühner	wie oben	Die desodor. Wirkungen zeigten sich zwei Tage nach der Verabreichung. Sie waren jedoch nicht so stark und verschwanden in etwa fünf Tagen.
Menschen	wie oben	wie oben

T a b e l l e 18-3

Desodorierungswirkung  
(per os)

Lebewesen	Stämme (FERM-P Nr)	
	2781	2782
Hunde	Der Stamm zeigte nahezu die gleichen desod. Wirkungen. Die Dauer der Desod. war jedoch etwas kürzer.	Der Stamm zeigte nahezu die gleichen desod. Wirkungen, während nahezu der gleichen Zeitdauer wie diejenigen des Stammes Nr. 2779

---

Schweine	wie oben	wie oben
----------	----------	----------

---

Hühner	wie oben	wie oben
--------	----------	----------

---

Menschen	wie oben	wie oben
----------	----------	----------

---

Von den oben erwähnten biologischen Eigenschaften und Ernährungserfordernissen wird deutlich, daß die erfindungsgemäßen Laktobazillusstämme mit Ausnahme der bei dem Genus Laktobazillus üblichen Eigenschaften unterscheiden sich in einem weiten Bereich bezüglich ihrer Eigenschaften wie Ernährungserfordernissen und der Fähigkeit Zucker zu zersetzen. Beispielsweise wachsen manche Stämme gemäß der Erfindung im (S-W)-Medium, und andere zeigen gute Wachstumseigenschaften im (S-W + Vitamine)-Medium. Es ist allgemein bekannt, daß, nachdem man eine Isolationstechnik für die Stämme bestimmt hat, es wesentlich leichter ist, viele ähnliche Stämme zu isolieren. In gleicher Weise gelang es dem Erfinder, viele desodorierende Laktobazillusstämme zu isolieren. Ungeachtet der Tatsache, daß verschiedene Eigenschaften dieser isolierten Stämme untersucht wurden, sind jedoch nur solche Stämme in der vorliegenden Erfindung beschrieben worden, die sich in ihren Eigenschaften unterscheiden, wobei die ähnlichen ausgelassen wurden. Nichtsdestoweniger zeigen die durch den Erfinder isolierten, erfindungsgemäßen Laktobazillusstämme deutlich,

709849/0993

wie ausführlich beschrieben wurde, daß sie gemeinsame Eigenschaften von grundsätzlicher biologischer Bedeutung besitzen. Diese gemeinsame Eigenschaften liegen in bemerkenswert niedrigeren Ernährungserfordernissen und einer schnelleren Wachstumsrate, verglichen mit den bekannten Laktobazillusstämmen. Auch die Endausbeute, die spezielle Sensibilität im Hinblick auf S.N.C.-Zusammensetzungen und Reaktionen auf verschiedene Aminosäuren wurden bei den bekannten Laktobazillusstämmen nicht beobachtet. Dementsprechend liegt eine besondere Bedeutung der Erfindung darin, daß die Stämme, die sich in ihren Eigenschaften individuell unterscheiden, doch gemeinsame, äußerst wichtige Merkmale besitzen, wenn man sie vom Standpunkt ihrer Desodorisierungsaktivität betrachtet. Dementsprechend lasse sie sich im Hinblick auf diese gemeinsamen Eigenschaften als "die desodorisierenden Laktobazillusstämmen" bezeichnen.

Die Nachforschungen, die sich mit den Laktobazillusstämmen selbst befassen, besitzen die längste Geschichte bezüglich der Bakteriologie und werden in vielen Ländern der Welt fortlaufend durchgeführt. In jedem Fall ist jedoch ein erfindungswesentlicher Schritt in der Ermittlung einer Beziehung zwischen den speziellen Eigenschaften der Stämme und ihrer desodorisierenden Wirkung zu erblicken.

Schlußbemerkung:

Die in der vorangehenden Beschreibung erwähnten Stämme sind im "Fermentation Research Institute (Agency of Industrial Science and Technology)" hinterlegt, wobei die Eingangsnummern dieses Forschungsinstitutes verwendet werden.

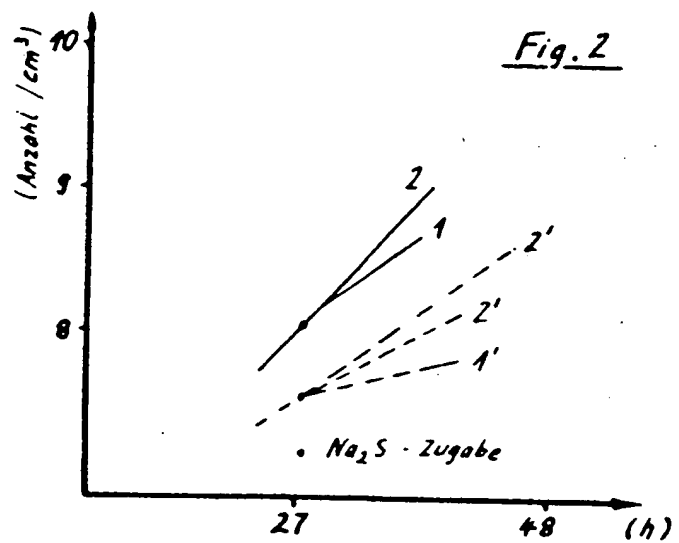
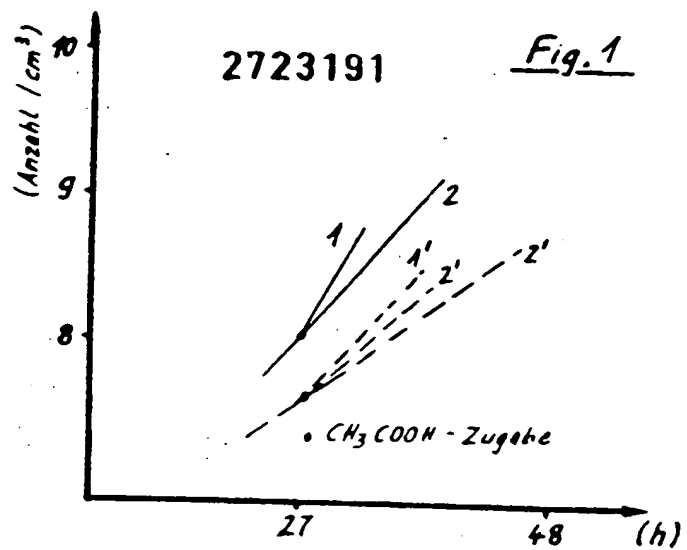
709849/0993

-57-

Nummer: 27 23 191  
Int. Cl. 2: C 12 K 3/00  
Anmeldetag: 23. Mai 1977  
Offenlegungstag: 8. Dezember 1977

NACHGERICHT

Fig. 1-4  
-7.7.77



- 53 -

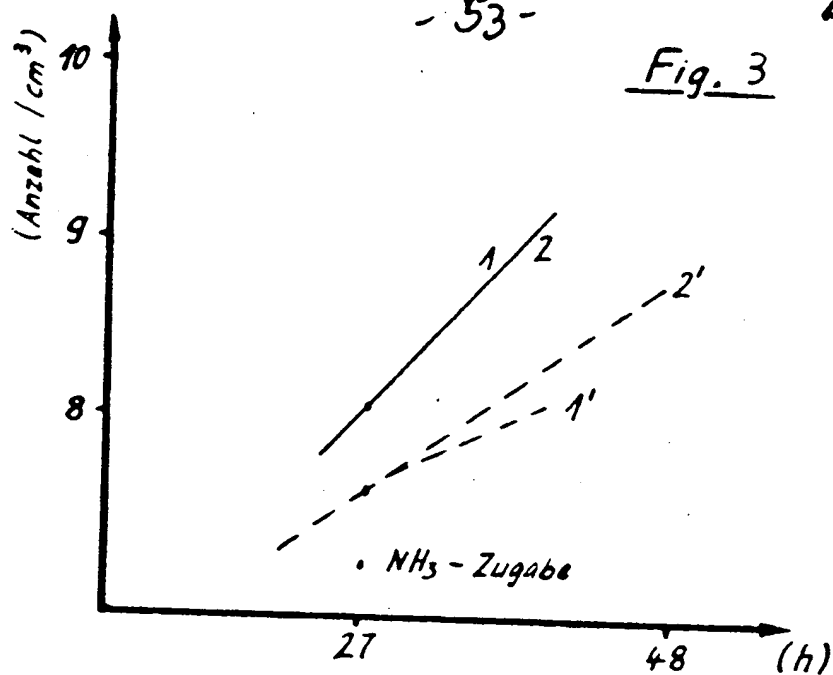
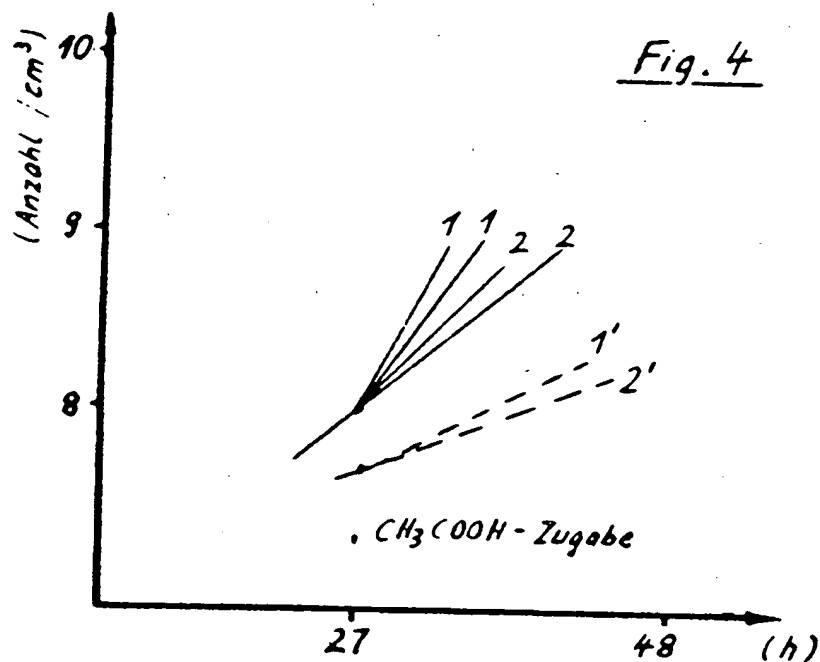
Fig. 3Fig. 4

Fig. 5

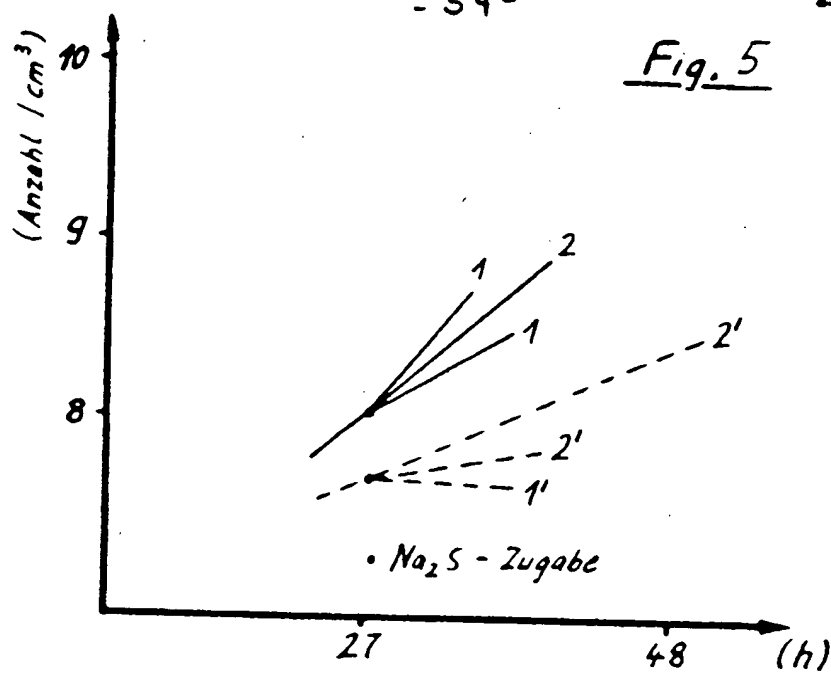
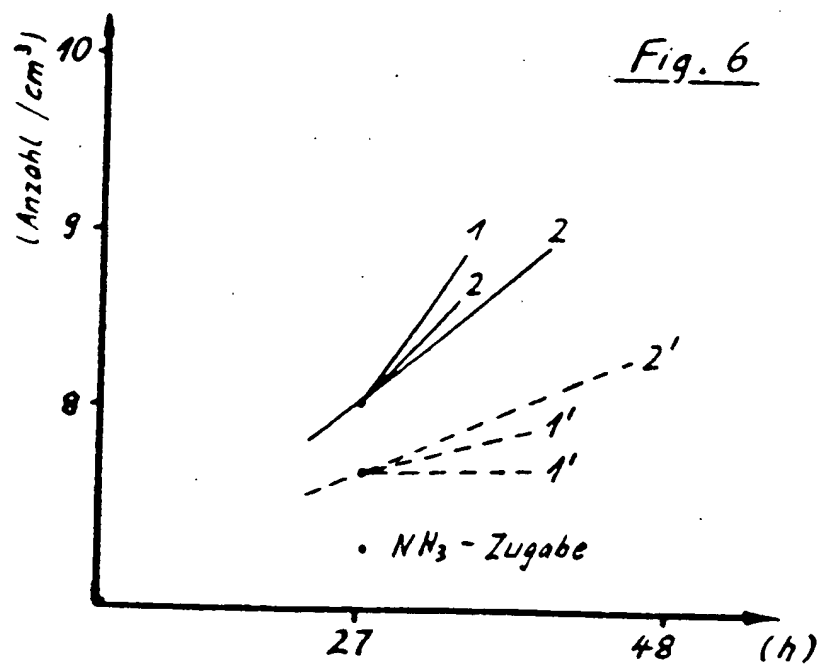


Fig. 6





- 55 -

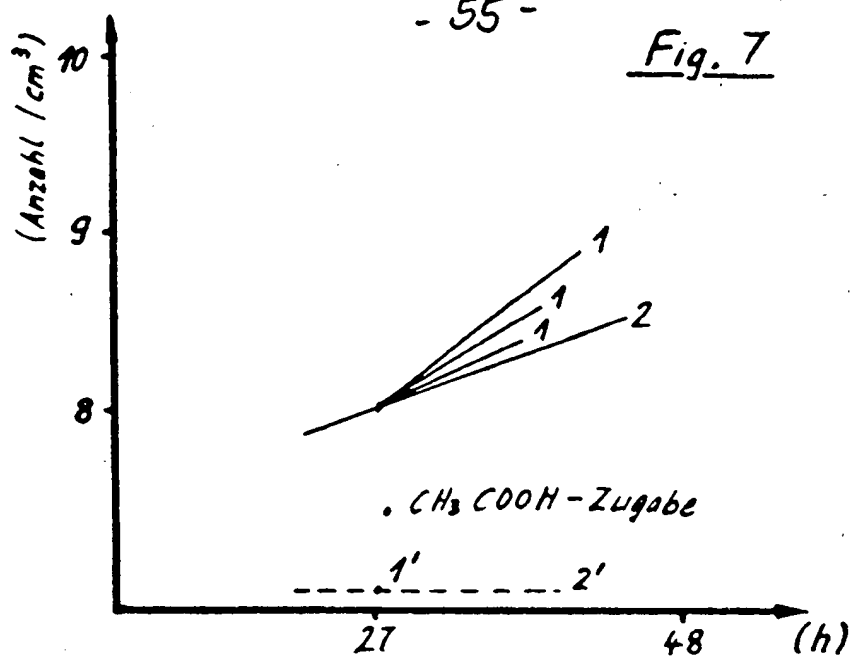
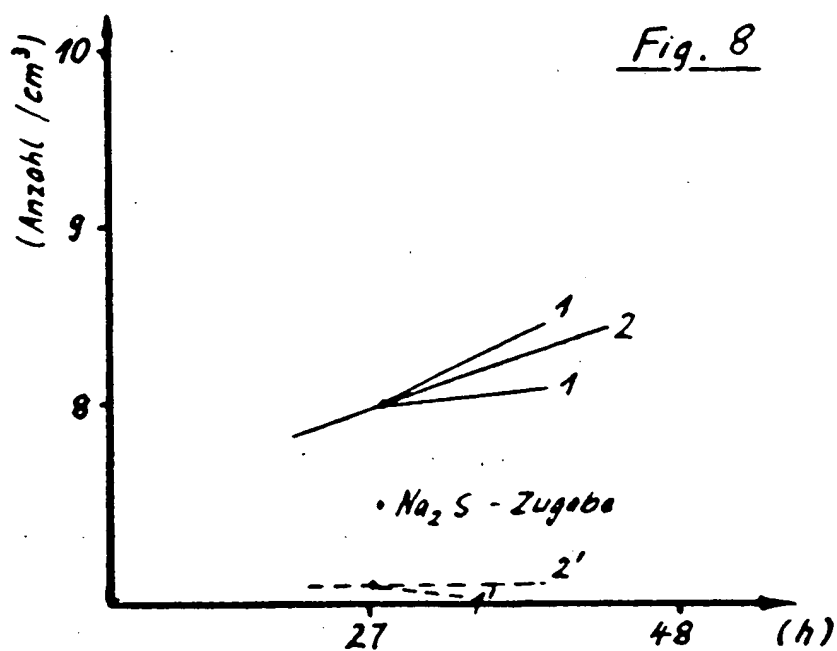
Fig. 7Fig. 8

Fig. 9

